

Terapia genică

**Dr. hab. m., prof.
Viorel Nacu**

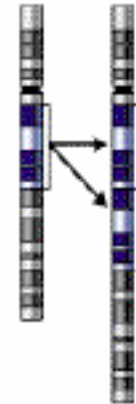
Mutations

Types of mutation

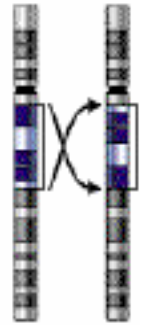
Deletion



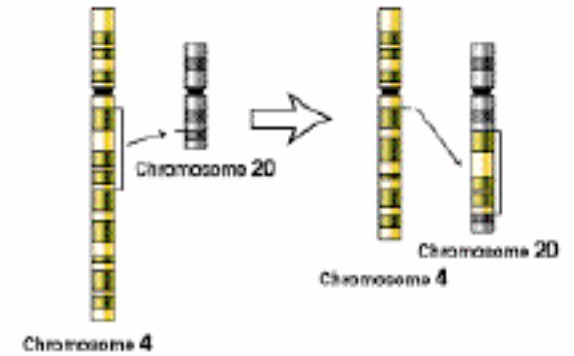
Duplication



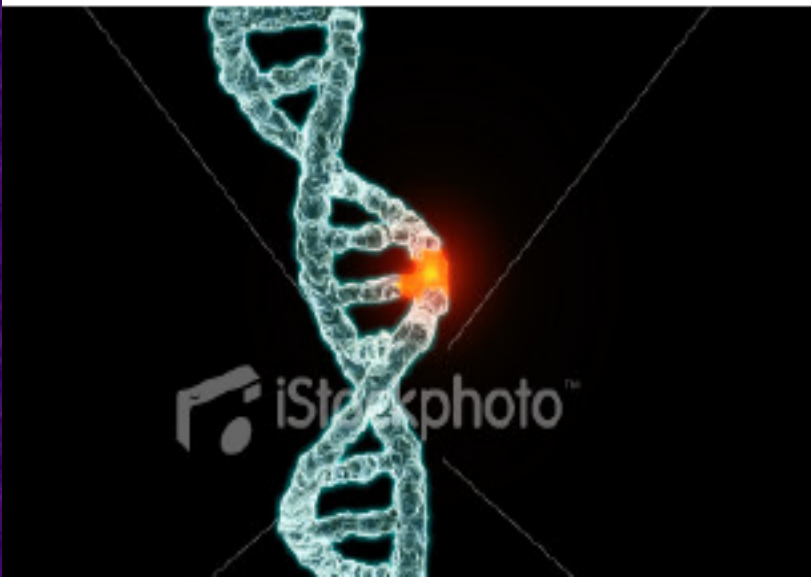
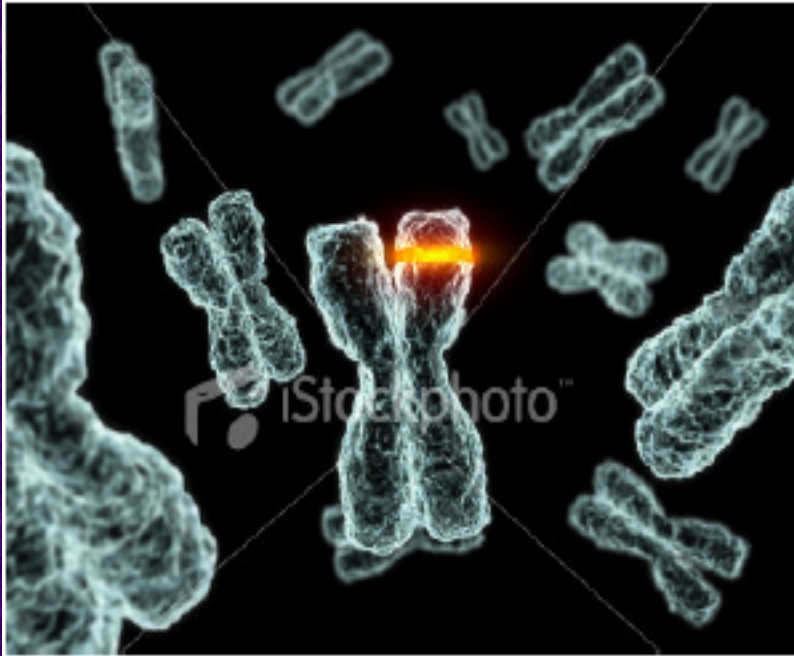
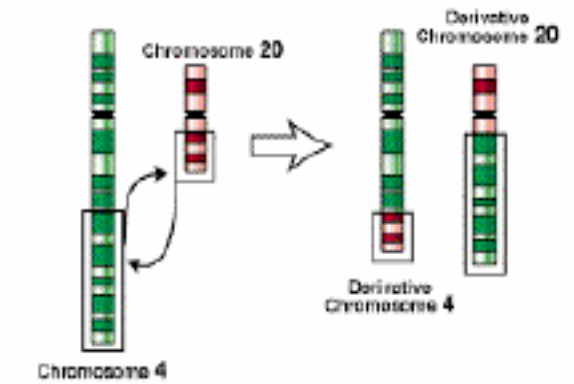
Inversion



Insertion

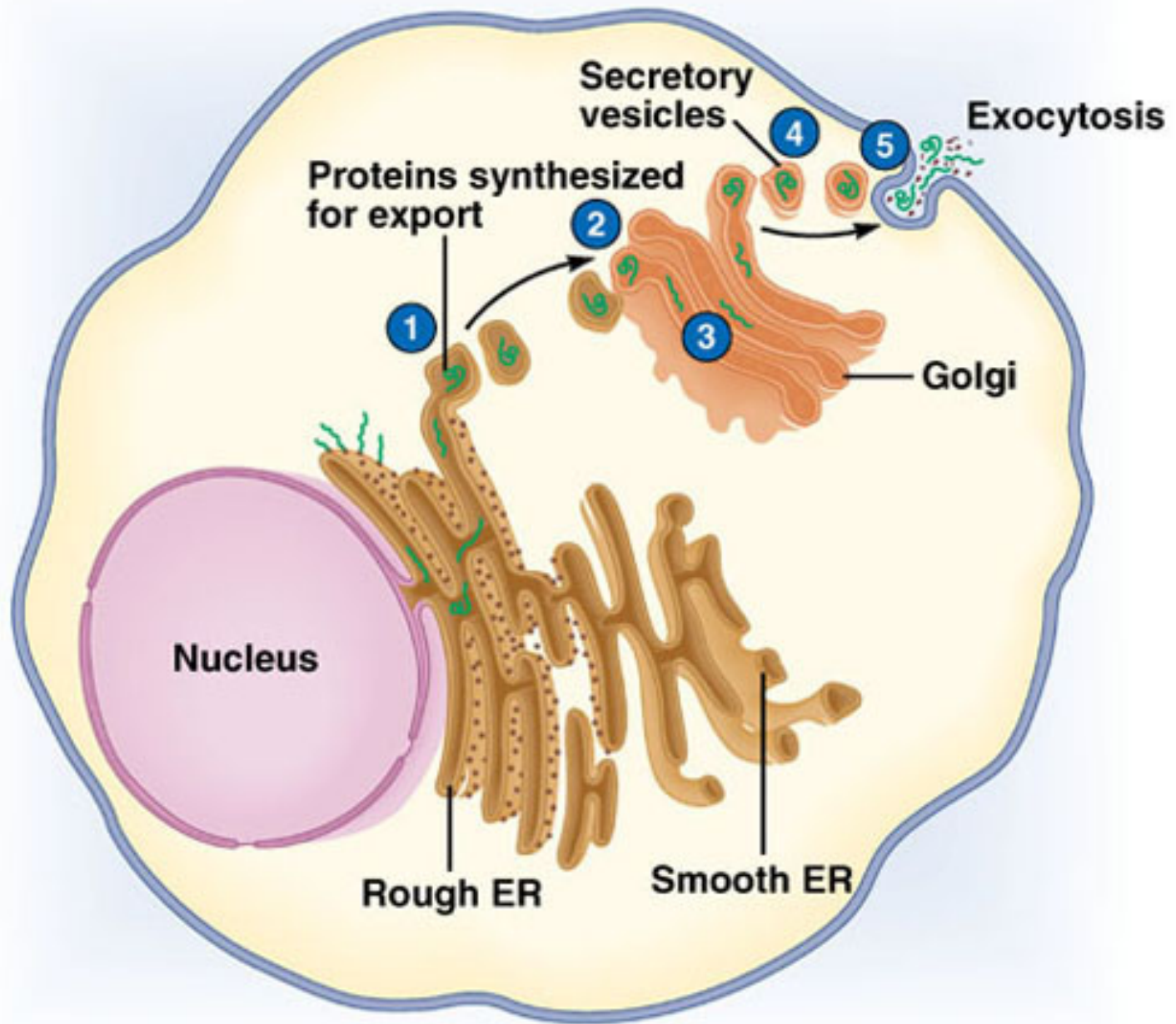


Translocation



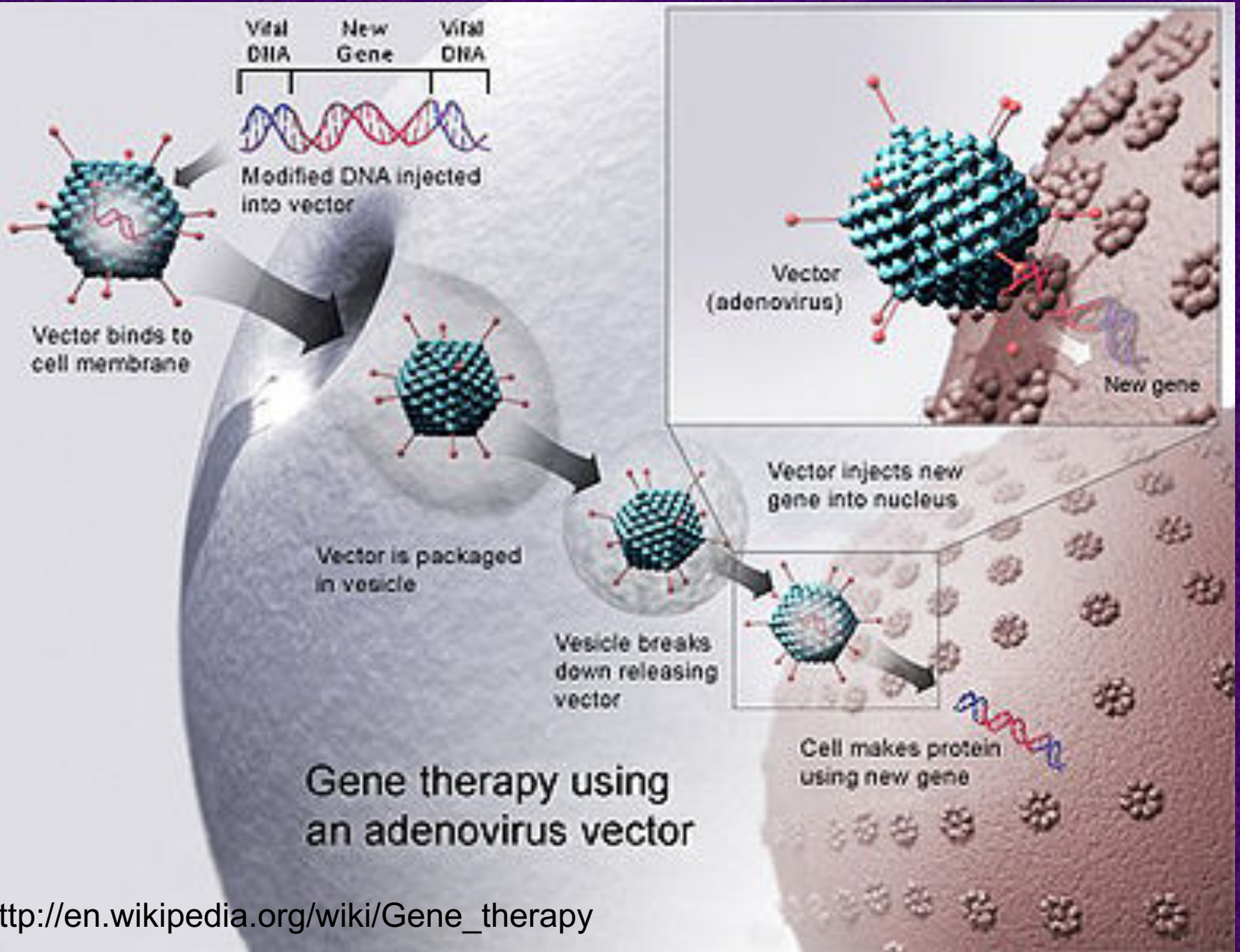
Citoplasma - Substanța înconjurată de membrana care conține:

- Cytosol - intracellular fluid containing dissolved nutrients, ions, soluble, and insoluble proteins, and waste products.**
- Organelles – specialized structures that perform specific functions related cell structure, growth, maintenance, and metabolism (except the nucleus)**
- Cytoskeleton – network of filaments and fibers.**
- Inclusions (storage substances – for example, fat droplets or glycogen)**



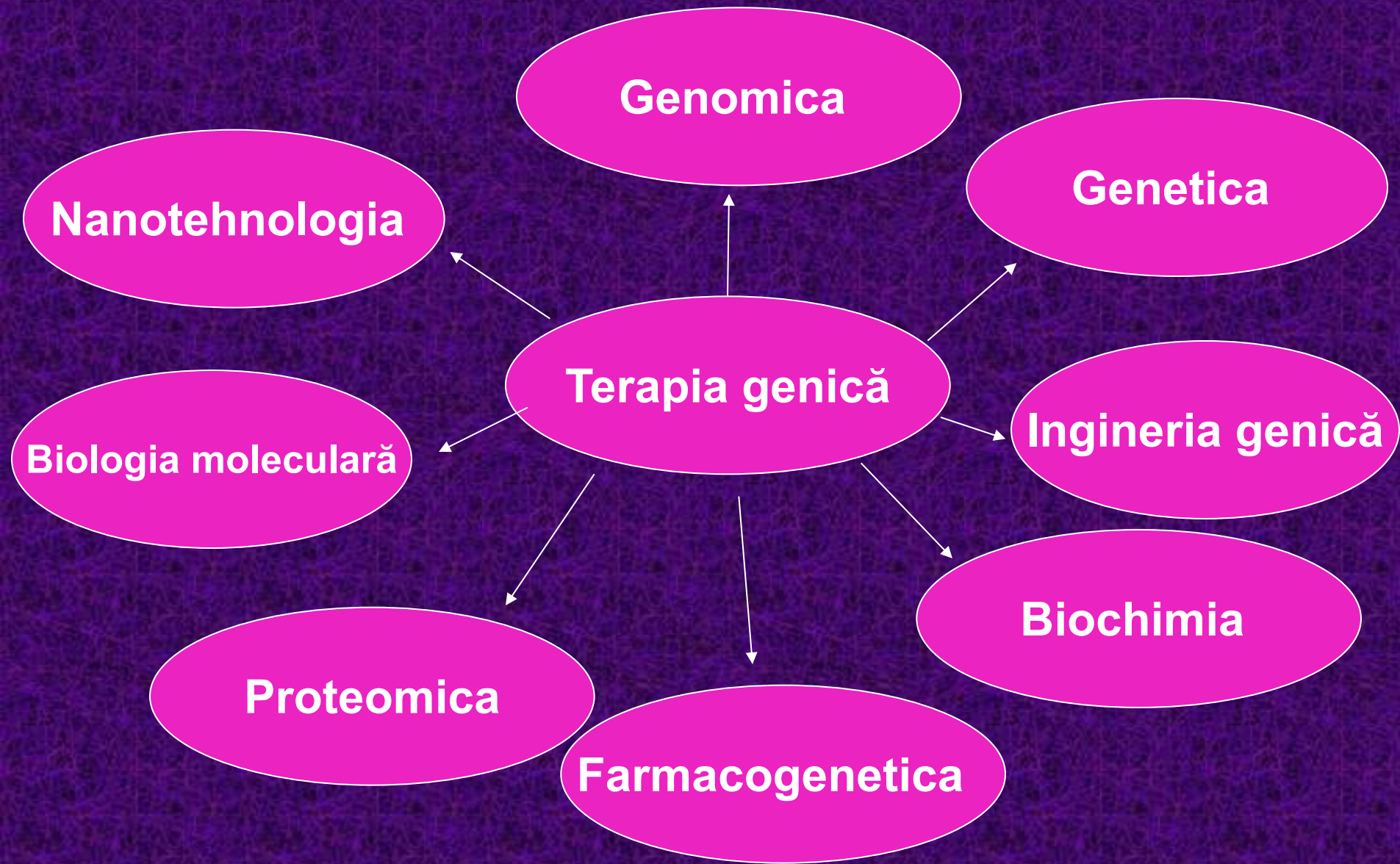
- Terapia genică este o metodă de a reduce alterarea informației genetice celulare, aplicabilă în tratamentul leziunilor prin transfer genetic, a codurilor factorilor specifici de creștere, în celule diferențiate sau celule progenitoare.

- Pentru expresia genetică, ADN-ul transferat trebuie să ajungă la nucleu, unde poate fi transcris.
- După aceasta, ARN-ul generat este transportat în afara nucleului, servind ca matrice pentru producerea, în ribozomi, a proteinelor, cum ar fi factori de creștere.



Pentru livrarea materialului genetic în celule pot fi utilizați vectori virali și nevirali.

Sistemele de livrare non-virale includ liposomi, ADN dezgolit și liganzi ADN, care sunt mai ușor de produs, posedând o toxicitate și imunogenitate mai mică, însă eficiența de livrare a lor este umbrită de rata scăzută a reușitei.



MALADII

MONOGENENICE – MENDELIENE

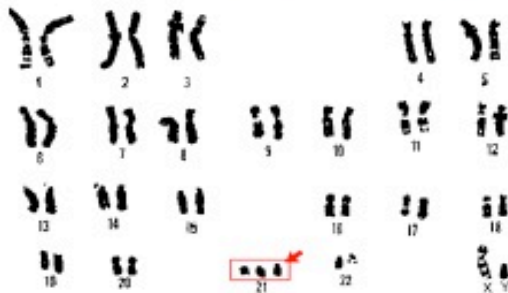
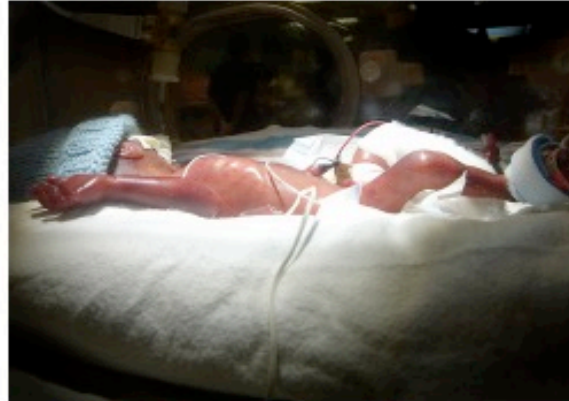
- 1 GENĂ = 1 MALADIE
- <10% din totalul patologiilor umane
- **Frequency less** 2% It' s childhood' disease
- Factorii de mediu nu influenteaza maladiile monogenice.

POLIGENICE – MULTIFACTORIALE – COMPLEXE

- Câteva gene cu mutații/sau polimorfizm => O Maladie.
- **Lion' s share is >90% great**
Min 1 Pair for 1 Person
- Mediul înconjurător are o influență considerabilă asupra acestor maladii.

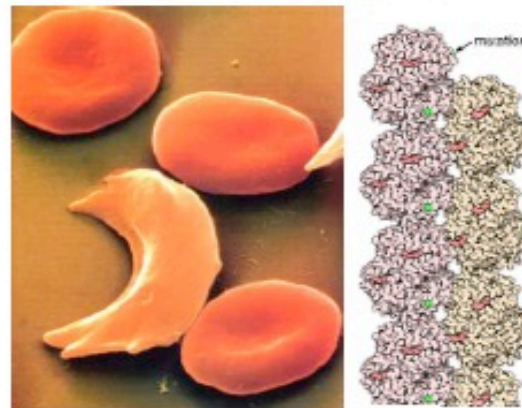
Maladiile Mendeliene sunt autosomal dominante, autosomal recesive, sex-dependente recesive, or sex-dependente dominante), și rezultă din mutație într-un singur loc.

Genetic Disorders



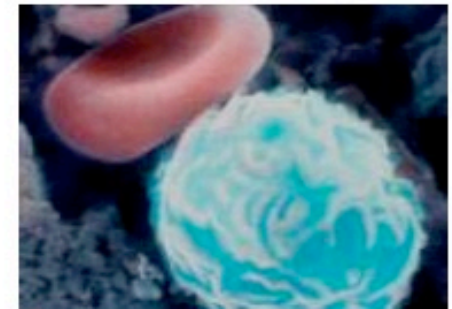
**Down syndrome
or trisomy 21**

1 per 1,000 births



Sickle cell disease

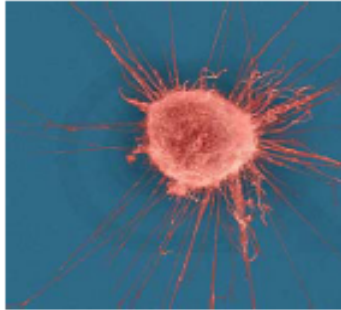
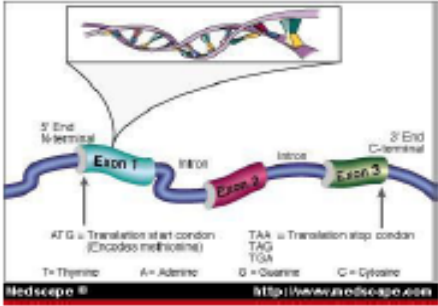
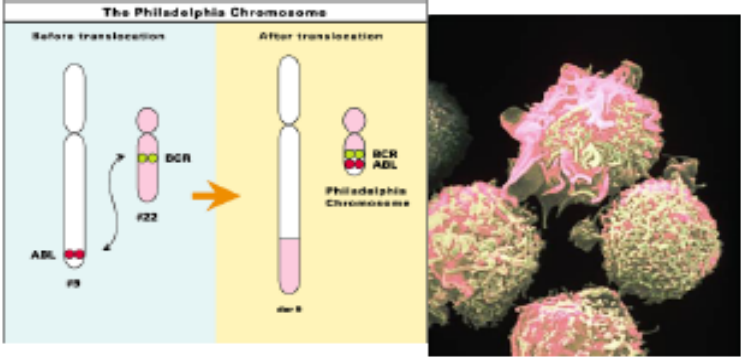
1 per 500 African-
American births



SCID disease

1 in 100,000 births

Maladiile multifactoriale poligenice



Leukemia

Breast Cancer

Ce este terapia genică?

Înlocuirea genelor defecte responsabile de maladie.

Depistare și distrugerea unor celule defecte cum ar fi celula canceroasa sau HIV

Inducerea producției unor proteine terapeutice care la implantare în organism, de exemplu ar stimula producerea interferonului pentru a distruge virușii hepatitei C

Clasificarea Terapiei genice

• tipul celulelor țintă:

- Terapie genică somatică
- Terapie genică germinativă

• tipul acțiunii:

- Pozitivă (compensarea expresiei genei)
- Negativă (supresia funcției genei)

• tipul introducerii (inoculării) agentului genoterapeutic:

- *In vivo* (inoculare sistemică)
- *In situ* (local)
- *Ex vivo* (celule)
- *In utero* (introducerea construcției în embrion)

• tipul sistemului de transport al genelor:

- Vectori virali
- Vectori nonvirali
- Microinjecția
- Gene gun (pistolul genic)
- Electroporare

•Tipul agentului genoterapeutic:

- Acizi nucleici
- Proteine
- imunizare

Terapia genică poate fi clasificată în două tipuri:

- **Terapia genică a celulelor Germinale.**

- În cazul terapiei genetice germinale, celulele germinale, de exemplu, sperma sau oocitul, sunt modificate prin introducerea de gene functionale, care sunt de regulă integrate în genomul lor.
- Această nouă abordare, teoretic, ar trebui să fie foarte eficientă în combaterea tulburărilor genetice și maladiilor ereditare. Cu toate acestea, multe jurisdicții interzic acest lucru pentru aplicarea pe ființe umane, cel puțin pentru prezent din considerențe etice sau tehnice.

Terapia genică somatică

- În terapia genică somatică, genele terapeutice sunt transferate în celulele somatice ale pacientului. Oricare modificare și efectele obținute vor fi limitate doar în cadrul unui pacient și nu va fi moștenită de descendenții pacientului sau generațiile mai târzii.

- Vectori genetici virali, cum ar fi retrovirusii, adenovirusii, virusii adenoasociați, herpetici, prezintă o modalitate mai eficientă de transfer genetic.

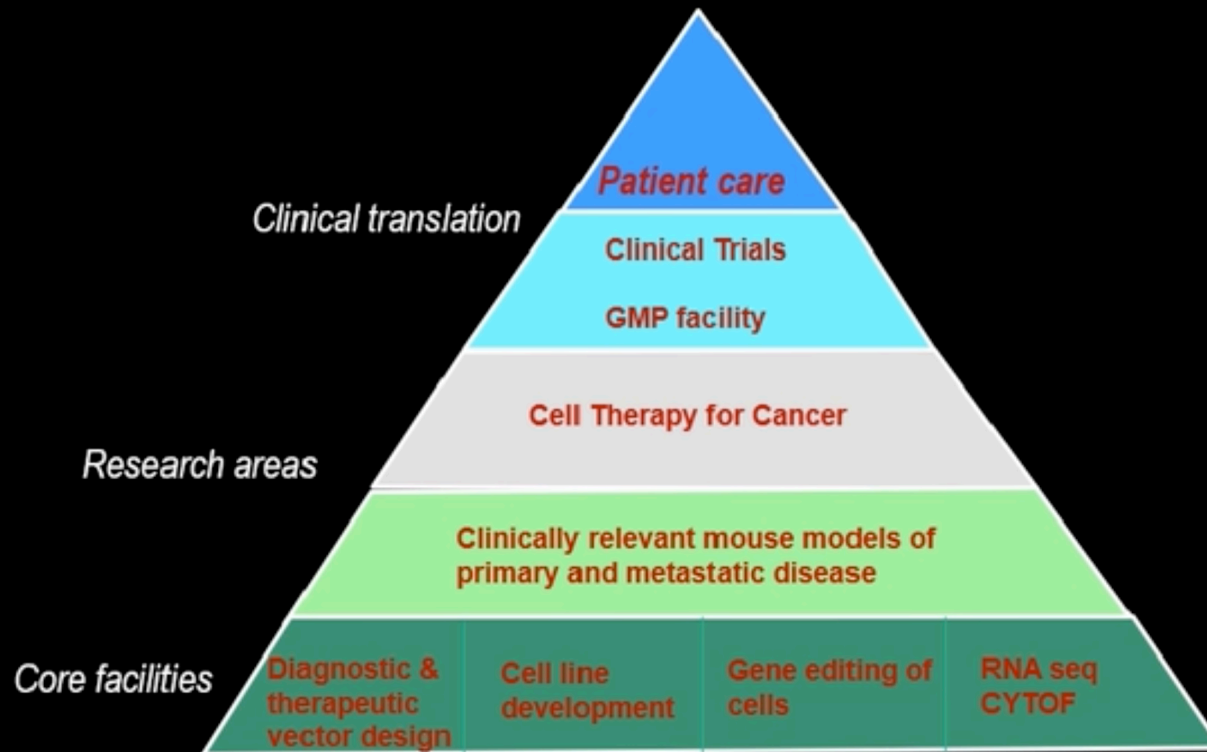
- Livrarea genelor în țesuturi e posibilă prin manipulare *in vivo* și *ex vivo*.
- Factorii pot fi injectați direct în țesutul-gazdă *in vivo* sau celulele din țesutul lezat sunt scoase, prelucrate genetic *in vitro* și reinjectate în țesutul afectat.
- Livrarea indirectă este mai puțin periculoasă, deoarece ingineria genică are loc în afara organismului, în condiții controlate.
- *Ex vivo*, factorii de creștere pot fi livrați prin celule endogene, capabile să răspundă la stimuli și să ia parte la procesul de vindecare a țesutului traumatizat.

- Terapia genetică poate reprezenta o terapie de ultima șansă pentru afecțiuni severe cum ar fi malignizările sau distrofia musculară Duchenne.
- Vectorii virali, integrându-se în genomul celulei, comportă riscul unor mutageneze inserționale. Posibila reglare anormală a creșterii celulare, toxicitatea, datorată supraexpresiei cronice a proteinelor factorului de creștere, dezvoltarea malignizării sunt consecințele **teoretice** ale terapiei genice, cazuri reale nefiind înregistrate.

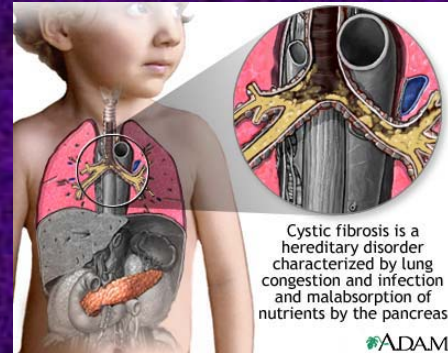
Metodele de bază în transportarea virusului



Our vision: Translating biological therapies into clinical care



Exemplu a *terapiei genică a celulei somatice in situ*
Infuzia a vectorilor adenovirali în trahee  i bronhii la
pacien ii cu fibroză citic .



- injectarea masei tumorale cu un vector care poartă gene pentru citochine sau toxin .



- Injectare genei dystrophin direct  n mu chii la pacien ii cu distrofie muscular .



Distribuirea protocoalelor clinice de transfer genic aprobate, sau Transmise autorităților responsabile în America de Nord și Europa

clinical protocols approved
by or submitted to regulatory authorities
in North America and Europe

Disease	Number of protocols	Vector	Number of protocols
Cancer	216	Rv	159
Infectious diseases	24	Ad (adenovirus)	58
Monogenic diseases	49	AAV	4
Cardivascular diseases	8	Poxviruses	19
Rheumatoid arthritis	2	HSV (herpes simple virus)	1
Cubital tunnel syndrome	1	Naked DNA	16
Total	300	Lipids	40
<i>In vivo</i> transfer	144	Gene gun	1
<i>Ex vivo</i> transfer	156	Electroporation	1
		Naked RNA	1
		Total	300

Vectori

- Virusi ARN *(Retrovirusi)*

1. Murine leukemia virus (MuLV)
2. Human immunodeficiency viruses (HIV)
3. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV)

- *Virusi ADN*

1. Adenoviruses
2. Adeno-associated viruses (AAV)
3. Herpes simplex virus (HSV)
4. Pox viruses

Vectori non virali

1. Liposomes
2. Naked DNA (histone free)
3. Liposome-polycation complexes
4. Peptide delivery systems

Gene gun (particle bombardment)



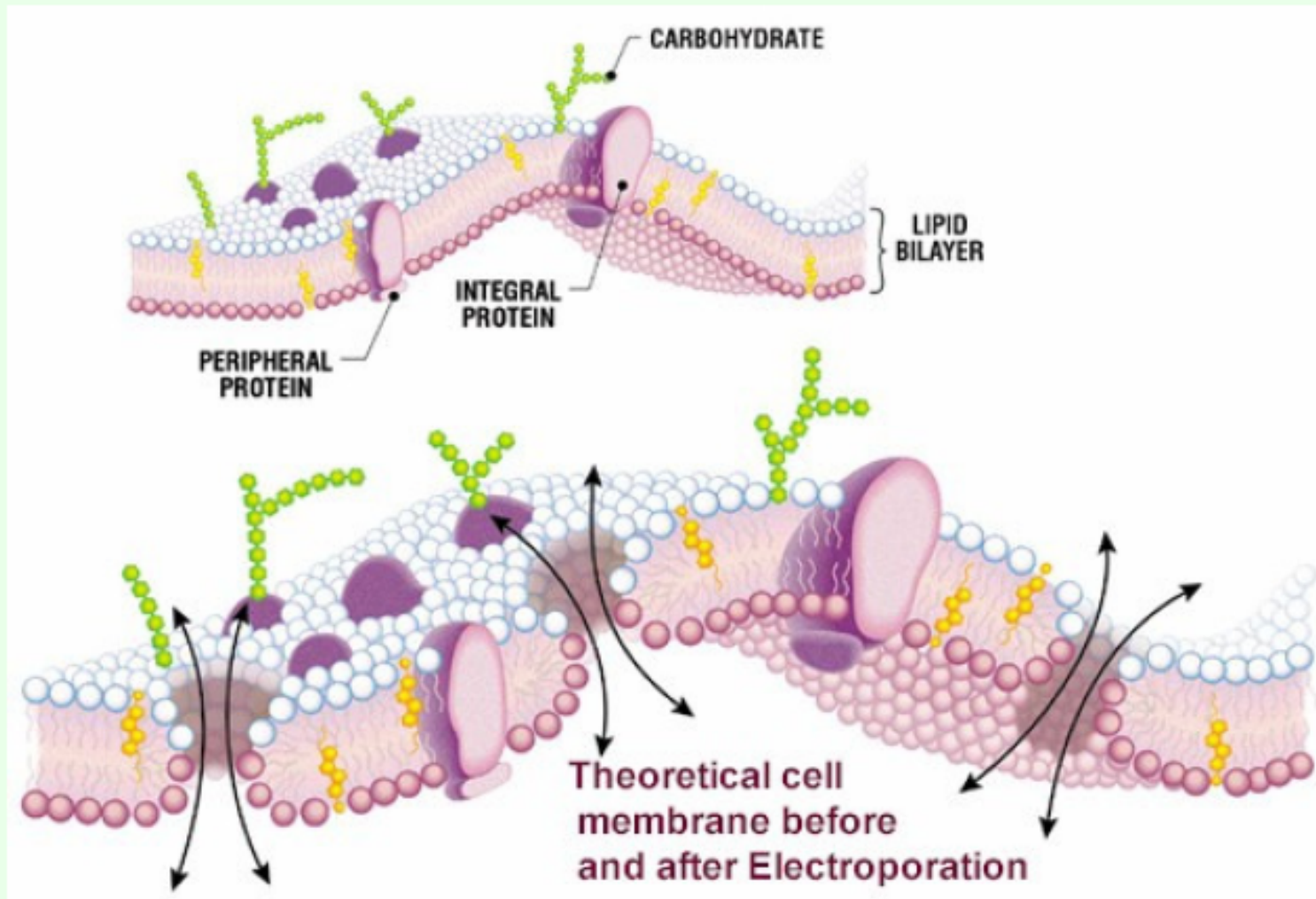
Helios Gene Gun
BIO-RAD

Direct injection/particle bombardment

Problems with this approach

- Poor efficiency of gene transfer
- Low level of integration

Electroporation

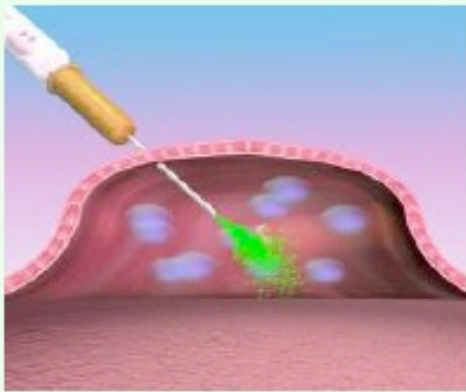


The MedPulser® System

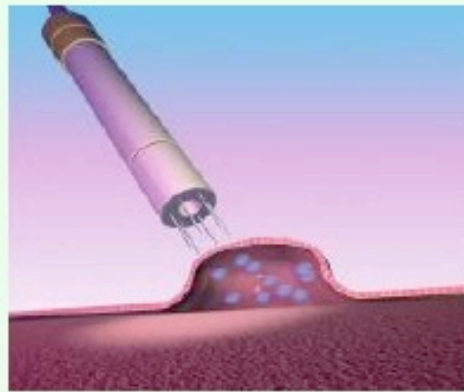
Genetronics



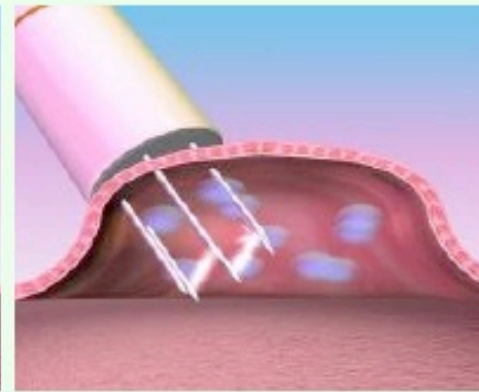
Electroporation



Intralesional injection
of the chemotherapeutic
into tumor

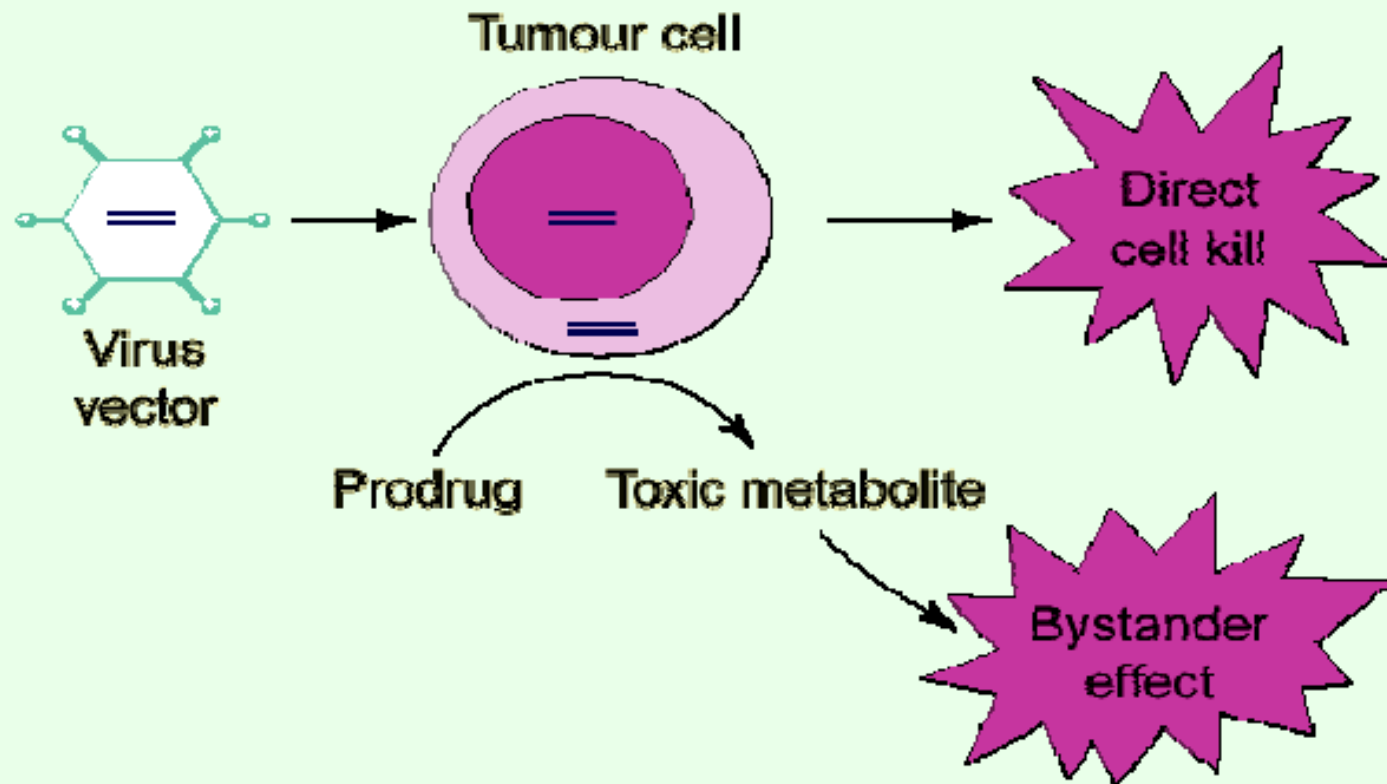


Insertion of the Electrode
Applicator into the tumor



EPT of the tumor using the
Genetronics MedPulser®

Suicide Gene Therapy



Success

2000-2002: 9 of 11 SCID children treated with retrovirus mediated *gamma C* gene, developed normal immune system.

2003 : In China, Gendicine became the world's first gene therapy approved for commercial production (for treatment of head and neck squamous cell carcinoma: result → cancer become smaller)

2006 : Skin cancer patients have successfully treated (the first demonstration that gene therapy can be effective in treating cancer: result → 2/17 cases are cancer-free for almost 2 yrs).

2007 : First promising results obtained from gene therapy trial for Parkinson's disease.

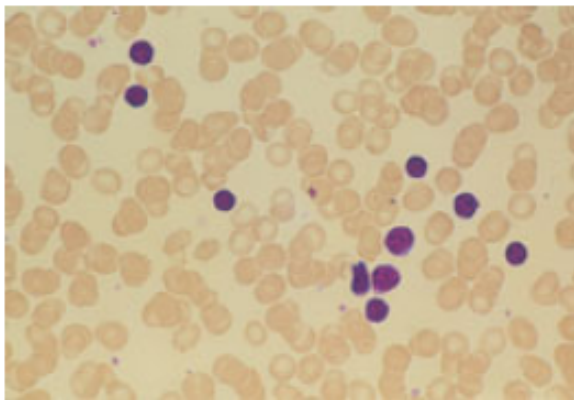
Terapia genică în restabilirea cartilajului

- Tehnicile de transfer genic aplicabile clinic în tratamentul leziunilor osteocondrale deocamdată lipsește. Studiile efectuate au demonstrat capacitatea condrocitelor de a fi transduse cu gene markeri *in vivo* și *in vitro*. Condrocitele transduse cu gena β -galactozidazei sunt capabile să se „agațe” de cartilaj și să exprime genele până la 7 săptămâni.
- Prima livrare cu succes a genelor potențial terapeutice s-a făcut prin administrarea genei TGR- β în articulațiile porcușorului de guineea Hartley, folosind un vector adenoviral.
- Cu toate că s-a înregistrat un progres evident în tratamentul genic, el nu poate fi, deocamdată, considerat o tehnică stabilă

Failure



1999 : 18 year-old Jesse Gelsinger died from multiple organ failure 4 days after treatment for ornithine transcarboxylase deficiency. (Death was triggered by severe immune response to adenovirus vectors)



2003- : 4/9 children developed leukemia after successful treatment for SCID disease. (Leukemia caused by insertion mutagenesis by retrovirus)

Un tratament care corecteaza erorile din codul genetic a fost pentru prima oara aprobat pentru comercializare in Europa.

Comisia Europeana a dat unda verde folosirii si comercializarii tratamentului Glybera, ceea ce inseamna ca poate fi aplicat oriunde in granitele Uniunii Europene, relateaza BBC.

Este vorba de un tratament pentru o boala rara, care face ca organismul sa nu poata digera optim grasimile. Producatorii spun ca tratamentul va fi disponibil incepand de anul viitor.

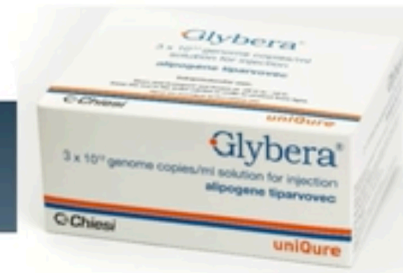
Un curs de terapie costă peste 1mln de dolari SUA.

AAV1 vectors have shown clinical efficacy in patients with lipoprotein lipase deficiency

Arterioscler. Throb. Vasc. Biol., 28: 2303-2304, 2008

Intramuscular Administration of AAV1-Lipoprotein Lipase^{S447X} Lowers Triglycerides in Lipoprotein Lipase –Deficient Patients

Erik S. Stroes, Melchior C. Nierman, Janneke J. Meulenberg, Remco Franssen, Jaap Twisk, C. Pieter Henny, Mario M. Maas, Aeilko H. Zwinderman, Colin Ross, Eleonora Aronica, Katherine A. High, Marcel M. Levi, Michael R. Hayden, John J. Kastelein and Jan Albert Kuivenhoven



Glybera was approved by the European Commission in October 2012 for the treatment of a subset of patients with lipoprotein lipase deficiency

(LPLD)

€1.11

MILLION/INJECTION/PATIENT

Vaccinele celulare

Vaccine Modalities

Cellular-based vaccines

- a) Whole tumor cells
- b) Gene-modified tumor cells
- c) Dendritic cells

Protein-based vaccines

- a) Proteins
- b) Peptides
- c) Agonist peptides
- d) Anti-idiotypic mAb
- e) mAb fusion proteins

Vector-based vaccines

- a) Viral vectors
- b) Bacterial vectors
- c) Yeast vectors
- d) Plasmid DNA

Effectors of the immune system

Cellular

CD4+ T cell

- produces cytokines
- helps for CD8+ T cells and B cells

CD8+ T cell (CTL)

- direct lysis/killing of antigen-expressing cells

B cell

- produces antibody (Ab)

Granulocyte

- Ab-dependent cytotoxicity

Macrophage

- cytokine-induced killing
- Ab-dependent cytotoxicity

Natural killer cell

- direct lysis of tumour cell target
- Ab-dependent cytotoxicity

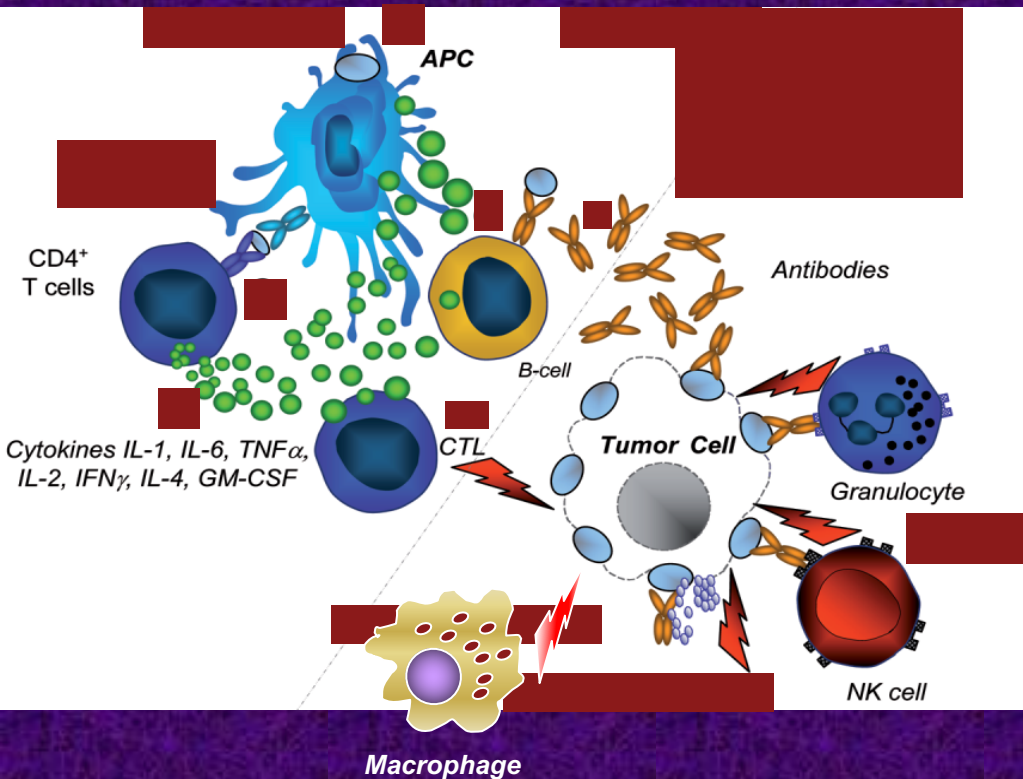
Molecular

Cytokine

- direct tumour killing (e.g. $\text{TNF-}\alpha$)

Antibody

- coating of tumour cell – ADCC, CDC



Mulțumesc pentru atenție !